临床研究

机械法准分子激光上皮瓣下角膜磨镶术后早期泪液中肝细胞生长因子含量与角膜上皮下雾状混浊的相关性

陈 静,韩苏宁,邹秀兰,邹玉平
广州军区广州总医院眼科,广东 广州 510010

摘要:目的 观察兔眼机械法准分子激光上皮瓣下角膜磨镶术(Epi-LASIK)术后早期泪液中肝细胞生长因子(HGF)含量的动态变化及其与角膜上皮下雾状混浊(雾状混浊)的关系。**方法** 24只(48眼)新西兰白兔,双眼分别建立切削深度100 μm Epi-LASIK和切削深度150 μm Epi-LASIK动物模型。采用酶联免疫反应吸附实验双抗体夹心法测定两组术前、术后3、7、14、30 d泪液中HGF的水平,并观察两组术后雾状混浊的情况。**结果** 不同切削深度两组Epi-LASIK术后角膜上皮均于3~5 d愈合。两组均于术后3 d开始形成雾状混浊,伴随泪液中HGF含量的升高。150 μm切削深度组术后3、7、14、30 d雾状混浊程度较100 μm组明显($P<0.05$),且泪液中HGF的水平明显高于100 μm组($P<0.05$)。**结论** 两组Epi-LASIK术后早期泪液中HGF与雾状混浊的程度表现为正相关,且与切削深度相关。
关键词: Epi-LASIK;泪液;肝细胞生长因子;雾状混浊

Association between hepatocyte growth factor in tears and corneal haze in rabbits early after epipolis laser in situ keratomileusis

CHEN Jing, HAN Suning, ZOU Xiulan, ZOU Yuping
Department of Ophthalmology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Command, Guangzhou 510010, China

Abstract: Objective To study the dynamic changes of levels of hepatocyte growth factor (HGF) in tears and their association with corneal haze in rabbits early after epipolis laser in situ keratomileusis (Epi-LASIK). **Methods** Twenty-four New Zealand rabbits received Epi-LASIK with an ablation depth of 100 μm in one eye and of 150 μm in the other eye. Before and at 3, 7, 14, and 30 days after the surgery, the level of HGF in tears collected from the rabbits was measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and corneal haze was graded after surgery. **Results** In all the rabbits, corneal epithelium healing occurred in 3 to 5 days after Epi-LASIK. Corneal haze appeared 3 days postoperatively in the rabbits accompanied by increased levels of HGF in tears. At 3, 7, 14, and 30 days after the surgery, the rabbits with an ablation depth of 150 μm showed more obvious corneal haze ($P<0.05$) and significantly higher levels of HGF in tears than those with an ablation depth of 100 μm ($P<0.05$). **Conclusion** In rabbits receiving Epi-LASIK, HGF levels in tears and the grade of corneal haze show a positive correlation early after the surgery and are both related with the depth of ablation.
Keywords: epipolis laser in situ keratomileusis; tear; hepatocyte growth factor; haze

角膜上皮下雾状混浊(雾状混浊)是准分子激光角膜表层屈光手术不可避免、也是最棘手的并发症之一,严重影响患者术后的视觉质量和远期疗效[1]。通过改进手术方法实施的机械法准分子激光上皮瓣下角膜磨镶术(Epi-LASIK)亦不能完全避免雾状混浊的发生[2-3]。角膜切削术后角膜损伤修复过程中角膜上皮增生及基质成纤维细胞活化,分泌和产生过多排列紊乱的胶原纤维是雾状混浊形成的基础[4]。肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)是少数能阻止纤维化的细胞生长因子之一,已有研究证明,HGF在抑制心、肝、肺、肾、皮肤、腹膜、肌腱等组织器官的纤维化及结构重建方面起重要作用[5-11],这为我们进一步研究其是否与Epi-LASIK术后雾状混浊相关提供了有益的启示。近年来泪液中发现的细胞因子在维持眼表正常功能及损伤修复过程中的作用越来越引起大家的关注[12-13]。本研究通过观察不同切削深度Epi-LASIK手术前后泪液中HGF含量的变化及Epi-LASIK术后雾状混浊的情况,探讨HGF与雾状混浊的关系。

收稿日期:2016-11-07
基金项目:广东省医学科研基金(B2010249)
作者简介:陈 静,硕士,副主任医师,E-mail: eyedoctorchenjing@163.com
通信作者:邹玉平,博士,主任医师,E-mail: gzzouyuping@126.com

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

健康普通级新西兰大白兔24只(由广州军区广州

总医院实验动物中心提供),月龄4~5个月,体质量2.0~2.5 kg,雌雄不限,术前眼科检查均正常。24只实验兔一眼行直径6 mm、切削深度100 μm Epi-LASIK手术,另一眼行直径6 mm、切削深度150 μm Epi-LASIK手术。

1.2 实验仪器和试剂

KM-5000D微型角膜上皮刀(江苏无锡康宁医疗电子设备开发公司),VISX star4准分子激光治疗仪(美国VISX公司),速眠新Ⅱ注射液和苏醒灵注射液(长春军需大学兽医研究所),兔子肝细胞生长因子(HGF)ELISA试剂盒(南京森贝伽生物科技有限公司),MultiskanMK3酶联免疫检测仪(Thennolab公司)。

1.3 兔眼Epi-LASIK模型的建立

24只实验兔术前2 d始左氧氟沙星眼液点眼,4次/d,手术当日庆大霉素冲洗结膜囊。速眠新Ⅱ注射液0.1 mL/kg肌肉注射全身麻醉,盐酸奥布卡因滴眼液表面麻醉。右眼:微型角膜上皮刀制作角膜上皮瓣,行光学区6.0 mm,切削深度100 μm准分子激光切削后,上皮瓣复位;左眼:行光学区6.0 mm,切削深度150 μm准分子激光切削。滴左氧氟沙星眼液、戴角膜接触镜、于睑裂三等分处间断缝合睑缘2针。术毕苏醒灵注射液按0.1 mL/kg肌肉注射催醒。术后左氧氟沙星眼液点眼,每日4次,共3 d。术后3 d拆除睑裂缝线并取出角膜接触镜,所有手术均由同一术者操作完成。

1.4 术后裂隙灯显微镜下观察角膜情况并记录术后雾状混浊程度及分级

术后观察角膜上皮愈合情况,并于术后3、7、14、30 d记录雾状混浊分级。雾状混浊分级标准按照Fantes标准[14]:0级(角膜完全透明);0.5级(裂隙灯显微镜下才能发现轻度点状混浊);1级(裂隙灯显微镜下容易发现混浊,但不影响观察虹膜纹理);2级(角膜混浊轻度影响观察虹膜纹理);3级(明显混浊中度影响观察虹膜纹理);4级(角膜白斑,不能窥见虹膜)。

1.5 泪液采集

准备好高压消毒灭菌后的直径5 mm的定量滤纸片和Eppendorf管,于术前和术后3、7、14、30 d每天同一时间用消毒后的眼科镊在术眼下穹窿结膜囊内放置消毒后的5 mm圆形滤纸片,约3 min后取出滤纸,立即放入Eppendorf管内,重复3次,置于−20 ℃冰箱内保存。泪液标本的采集均由同一人操作。

1.6 HGF含量检测

采用双抗体夹心ABC-ELISA法检测采集的泪液标本中HGF含量。用抗兔HGF单抗包被于酶标板上,标准品和样品中的HGF与单抗结合,加入生物素化的抗兔HGF,形成免疫复合物连接在板上,辣根过氧化物酶标记的Streptavidin与生物素结合,加入底物工作液显蓝色,最后加终止液硫酸,在450 nm处测A值,通过绘制标准曲线求出标本中HGF浓度。

1.7 统计学分析

采用SPSS17.0统计软件处理数据,以均数±标准差表示,采用t检验和相关分析对计量资料进行统计学处理,$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 角膜上皮愈合情况

不同切削深度两组Epi-LASIK术后所有角膜上皮均于3~5 d愈合。切削深度100 μm组和切削深度150 μm组角膜上皮愈合时间分别为3.79±0.88 d和4.01±0.71 d,两组差异无统计学意义(t=0.95,P=0.35)。表明切削深度对角膜上皮愈合无明显影响。

2.2 术后雾状混浊程度及分级

观察不同切削深度两组术后3、7、14、30 d雾状混浊情况并记录两组雾状混浊平均等级(表1)。在未采用任何干预雾状混浊形成措施的情况下,两组术后均未发现3级及以上雾状混浊产生。两组术后3 d开始出现雾状混浊,14 d以后雾状混浊有所减轻。术后3、7、14、30 d切削深度150 m组雾状混浊较100 μm组重($P<0.05$,表1)。

表1 两组术后不同时间点雾状混浊平均等级的比较

Tab.1 Comparison of haze grade between the two groups at different time points after operation (*Mean±SD*)

Group	Time after operation			
	3 d	7 d	14 d	30 d
100 μm	0.23±0.22	1.14±0.30	0.88±0.27	0.64±0.40
150 μm	0.42±0.32	1.46±0.36	1.20±0.33	0.92±0.39
t	2.40	3.35	3.68	2.46
P	0.02	0.002	0.006	0.02

2.3 术后泪液中HGF含量变化

记录不同切削深度两组术前及术后3、7、14、30 d泪液中HGF含量(表2)。两组术后3、7、14 d和切削深度150 μm组术后30 d泪液中HGF含量与术前比较差异均有统计学意义($P<0.05$,表2),切削深度100 μm组术后30 d泪液中HGF含量仍略高于术前。术后3、7、14、30 d切削深度150 μm组泪液中HGF含量明显高于100 μm组($P<0.05$,表2)。

2.4 泪液中HGF与雾状混浊形成的关系

不同切削深度两组在Epi-LASIK术后3、7、14、30 d泪液中HGF含量与雾状混浊的平均等级之间表现出明显正相关($P<0.05$)。

3 讨论

本实验中兔眼Epi-LASIK术后角膜上皮愈合时间

表2 两组术后不同时间点泪液中HGF含量变化

Tab.2 Comparison of HGF in tears between the two groups at different time points after the operation (pg/mL, *Mean*±*SD*)

Group	Pre-operation	Time after operation			
		3 d	7 d	14 d	30 d
100 μm	192.12±24.32	463.54±90.44*	776.34±86.16*	349.10±77.54*	207.55±82.62
150 μm	189.43±26.15	521.76±79.51*	822.22±60.24*	418.63±62.88*	261.56±89.94*
t	0.37	2.37	2.14	3.41	2.17
P	0.71	0.02	0.04	0.001	0.04

*P<0.05 different times after operation *vs* Pre-operation.

为3~5 d,与其他研究者的报道相似[15]。实验中切削深度150 μm组术后雾状混浊明显高于切削深度100 μm组,符合其他学者关于雾状混浊与切削深度关系的研究结果,切削深度越深,角膜屈光手术后雾状混浊越明显[16]。

既往研究表明HGF不仅在角膜生理平衡方面发挥作用,而且在角膜的损伤修复过程中起着重要作用。角膜组织主要由角膜上皮细胞、角膜纤维细胞和角膜内皮细胞三种细胞组成。通过动物实验得出角膜内皮细胞和纤维细胞可产生HGF并表达HGF受体,而角膜上皮细胞仅表达HGF受体,但体外角膜组织研究表明角膜上皮细胞也可以表达HGF,只是表达的含量很低。同时泪液、泪腺及泪膜中也测出HGF的存在[17]。本实验中两组术前泪液中存在一定含量的HGF,说明正常机体状态时,泪液中存在的微量HGF调节着正常角膜上皮细胞的代谢平衡。Epi-LASIK手术制作角膜上皮瓣,产生上皮损伤,上皮细胞释放的细胞因子介导浅层基质角膜细胞的凋亡并诱发切除区周围残留的角膜细胞开始增殖,同时邻近的基质内成纤维细胞开始激活、增殖并在损伤后重新分布于前基质。既往研究表明角膜损伤后角膜成纤维细胞的HGF和受体的mRNA的表达明显增强,HGF和其受体分泌增加,角膜成纤维细胞分泌的HGF通过旁分泌作用于角膜上皮细胞,与角膜上皮细胞表达的其特异性受体结合[17]。本实验中两组Epi-LASIK术后早期兔眼泪液中HGF含量明显上升,我们推测泪液中HGF与角膜成纤维细胞分泌的HGF共同通过旁分泌作用于角膜上皮细胞,促进角膜上皮细胞增殖分化迁移,完成其早期损伤修复。这与其他学者研究结论相同,在角膜损伤中HGF可以促进角膜上皮修复[18]。角膜上皮的完整性是减少屈光手术后雾状混浊的关键所在[19],因此泪液中HGF有可能是阻止屈光手术后雾状混浊有益的细胞生长因子。角膜创伤后转化生长因子$β_1$($TGF-β_1$)通过对炎症细胞、上皮细胞和成纤维细胞的趋化、迁移、增生和分化作用来调节修复过程,并促进细胞外基质成分的合成和分泌,同时抑制胶原酶的合成,降低胶原纤维的分解,造成上皮下基质胶原纤维堆积[20-21]。$TGF-β_1$是导致角膜屈光手术后雾状混浊的关键细胞因子,$TGF-β_1$能诱导活化的角膜细胞向肌成纤维细胞转化,而肌成纤维细胞的出现是影响角膜透明性即雾状混浊形成的主要决定因素[12, 21-22]。在其他组织器官:如心、肝、肾、皮肤、肌腱、口腔黏膜等,有研究发现,HGF能通过抑制$TGF-β_1$达到抑制纤维化的作用,促纤维化细胞因子$TGF-β_1$与抗纤维化细胞因子HGF的失衡是组织器官纤维化发生、发展的重要机制[10, 23-27]。既往研究表明,泪液中$TGF-β_1$含量与角膜屈光手术后雾状混浊程度呈正相关[22]。本实验中Epi-LASIK术后早期切削深度150 μm组泪液中HGF含量高于100 μm组,泪液中HGF含量与雾状混浊的平均等级之间表现出正相关。因此我们推测在角膜屈光手术后,HGF有可能是通过拮抗$TGF-β_1$来发挥抑制雾状混浊的作用。故切削越深,角膜雾状混浊越严重,机体产生相应越多的内源性HGF来促进角膜修复,当内源性HGF不能充分抵消$TGF-β_1$的作用时,便产生了雾状混浊。能否通过增加外源性HGF使其与$TGF-β_1$达到某种再平衡,为干预角膜屈光手术后雾状混浊提供了新的思路。

综上所述,HGF参与了Epi-LASIK术后早期角膜伤口愈合过程,泪液中HGF与雾状混浊的程度表现为正相关,且与切削深度相关。但HGF在角膜屈光手术后雾状混浊中的作用及分子生物学机制仍需进一步探讨。

参考文献:

[1] 张 钰, 陈跃国. 当代准分子激光角膜表层消融术[J]. 中华眼视光学与视觉科学杂志, 2016, 18(2): 65-8.

[2] Torricellia A, Santhanam A, Wu J, et al. The corneal fibrosis response to epithelial-stromal injury[J]. Exp Eye Res, 2016, 142: 110-8.

[3] Wu W, Wang Y, Xu L. Epipolis-laser in situ keratomileusis versus photorefractive keratectomy for the correction of myopia: a meta-analysis[J]. Int Ophthalmol, 2015, 35(5): 757-63.

[4] Du Z, Zhao W, Huang Z, et al. Inhibition effect of tetrandrine on haze formation after Epi-LASIK surgery in rabbits[J]. Curr Eye Res, 2011, 36(8): 699-705.

[5] Li M, Yi X, Ma L, et al. Hepatocyte growth factor and basic fibroblast growth factor regulate atrial fibrosis in patients with atrial fibrillation and rheumatic heart disease *via* the mitogen-activated

protein kinase signaling pathway[J]. Exp Ther Med, 2013, 6(5): 1121- 6.

[6] Chakraborty S, Chopra P, Hak A, et al. Hepatocyte growth factor is an attractive target for the treatment of pulmonary fibrosis[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2013, 22(4): 499-515.

[7] Abd-Elgawad H, Abu-Elsaad N, El-Karef A, et al. Piceatannol increases the expression of hepatocyte growth factor and IL-10 thereby protecting hepatocytes in thioacetamide-induced liver fibrosis[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2016, 94(7): 779-87.

[8] Du T, Zou X, Cheng J, et al. Human Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells reduce renal fibrosis through induction of native and foreign hepatocyte growth factor synthesis in injured tubular epithelial cells[J]. Stem Cell Res Ther, 2013, 4(3): 59.

[9] Xiao Z, Xi C. Hepatocyte growth factor reduces hypertrophy of skin scar: *in vivo* study[J]. Adv Skin Wound Care, 2013, 26(6): 266-70.

[10] Cui Q, Fu S, Li Z. Hepatocyte growth factor inhibits TGF-β1-induced myofibroblast differentiation in tendon fibroblasts: role of AMPK signaling pathway[J]. J Physiol Sci, 2013, 63(3): 163-70.

[11] Matsuoka T, Maeda Y, Matsuo K, et al. Hepatocyte growth factor prevents peritoneal fibrosis in an animal model of encapsulating peritoneal sclerosis[J]. J Nephrol, 2008, 21(1): 64-73.

[12] Chen J, Chen Y, Han SN. Comparison of TGF-β1 in tears and corneal haze following Epi-LASIK with and without mitomycin C [J]. Int J Ophthalmol, 2013, 6(3): 312-5.

[13] Zhang Y, Chen YG, Xia YJ, et al. Comparison of Tear cytokines and clinical outcomes between off-flap and on-flap epi-LASIK with mitomycin C[J]. J Refract Surg, 2012, 28(9): 632-8.

[14] Fantes FE, Hanna KD, Waring GO, et al. Wound healing after excimer laser keratomileusis (photorefractive keratectomy)in monkeys[J]. Arch Ophthalmol, 1990, 108(5): 665-75.

[15] 陈艳蕾, 郭海科, 张洪洋, 等. 兔Epi-LASIK上皮瓣弃留对角膜基质TGF-β1、bFGF表达及细胞凋亡的影响[J]. 眼科新进展, 2013, 33(12): 1115-9.

[16] 蒋林志, 谭少健, 黄崧健. 准分子激光角膜表层切削术后角膜上皮下雾状混浊的研究现状[J]. 广西医学, 2011, 33(9): 1185-7.

[17] Grierson I1, Heathcote L, Hiscott P, et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor in the eye[J]. Prog Retin Eye Res, 2000, 19(6): 779-802.

[18] Omoto M, Suri K, Amouzegar A, et al. Hepatocyte growth factor suppresses inflammation and promotes epithelium repair in corneal injury[J]. Mol Ther, 2017, 25(8): 1881-8.

[19] 韩 伟, 郝俊华, 任延军, 等. LASEK手术中上皮瓣的完整性与Haze的关系. 河北医药, 2012, 38(18): 2789-90.

[20] Janin-Manificat H, Rovere MR, Galiacy SD, et al. Development of *ex vivo* organ culture models to mimic human corneal scaring[J]. Mol Vis, 2012, 18: 2896-908.

[21] 樊廷俊, 白苏冉. 角膜基质创伤愈合的研究进展[J]. 山东大学学报: 理学版, 2016, 51(3): 1-10.

[22] Long Q, Chu R, Zhou X, et al. Correlation between TGF-beta1 in tears and corneal haze following LASEK and epi-LASIK [J]. J Refract Surg, 2006, 22(7): 708-12.

[23] Naim R, Naumann A, Barnes J, et al. Transforming growth factor-beta1-antisense modulates the expression of hepatocyte growth factor/scatter factor in keloid fibroblast cell culture[J]. Aesthetic Plast Surg, 2008, 32(2): 346-52.

[24] Yu JL, Li JH, Chengz RG, et al. Effect of matrine on transforming growth factor β1 and hepatocyte growth factor in rat liver fibrosis model[J]. Asian Pac J Trop Med, 2014, 7(5): 390-3.

[25] Iekushi K, Taniyama Y, Azuma J, et al. Hepatocyte growth factor attenuates renal fibrosis through TGF-β1 suppression by apoptosis of myofibroblasts[J]. J Hypertens, 2010, 28(12): 2454-61.

[26] Yi X, Li X, Zhou Y, et al. Hepatocyte growth factor regulates the TGF-β1-induced proliferation, differentiation and secretory function of cardiac fibroblasts[J]. Int J Mol Med, 2014, 34(2): 381-90.

[27] Dally J, Khan JS, Voisey A, et al. Hepatocyte growth factor mediates enhanced wound healing responses and resistance to transforming growth factor β1 driven myofibroblast differentiation in oral mucosal fibroblasts[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(9) pii: E1843.

（编辑：吴锦雅）